

【目的】 変異タンパク質の発現やカルシウムイオンの恒常性破綻によって小胞体の機能に異常をきたすと小胞体内腔に折りたたみ不全タンパク質が大量に蓄積する（小胞体ストレス）。小胞体ストレスは神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の発症や病態形成と密接に関わることが報告されている。小胞体ストレスが発生すると、小胞体ストレスセンサーとして機能するATF6やOASISファミリー（BBF2H7、OASIS、AlbZIP、Luman、CREBH）はsite-1 protease（S1P）およびS2Pによる2段階の膜内切断を受けて活性化し、小胞体ストレスを回避するためのシグナルを発信する。本研究課題では、BBF2H7が小胞体ストレス依存的な2段階の切断を受ける際に産生されると予想される小ペプチド断片（小胞体マイクロフラグメント）の物性ならびに生理的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 BBF2H7 もしくは BBF2H7 の S1P 認識配列に変異を加えたコンストラクトを挿入した発現プラスミドを遺伝子導入したヒト胎児腎がん由来細胞 HEK293T 細胞もしくは S2P 欠損 CHO 細胞（M19 細胞）の細胞破碎液を用いて western blotting を行った。

小胞体マイクロフラグメントのアミノ酸配列を決定するために、N もしくは C 末端側に GST を融合させた BBF2H7 を HEK293T 細胞に発現させて小胞体ストレスを負荷し、産生された GST 融合 BBF2H7 の N もしくは C 末端断片を回収・精製した後、トリプシン消化して末端配列を LC-MS/MS 解析によって調べた。また、小胞体マイクロフラグメントを特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行ってマイクロフラグメントを回収し、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解読を行った。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性を検討するために、人工的に合成した小胞体マイクロフラグメントを 37°C でインキュベート後、透過型電子顕微鏡によってその形態を観察した。

【結果】 BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは小胞体ストレス依存的に S1P および S2P による段階的な膜内切断を受けて産生されることを見出した。BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは S2P による少なくとも 3 カ所以上の膜内切断を受けて産生されることと、主要な BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは BBF2H7 の 386 番目から 430 番目に存在する 45 個のアミノ酸が切り出されたペプチド断片であることが分かった。このフラグメントは高い凝集性を示し、fibril 様構造を形成することがわかった。

小胞体ストレスセンサーの切断と小胞体マイクロフラグメントの産生

